

EXPÉRIENCES D'ENZYMOLOGIE AVEC L'ÉLECTRODE À OXYGÈNE ET LE SYSTÈME D'ACQUISITION ORPHY - REGRESSI

3^{ème} PARTIE : RÉALISATION D'UN BIOCAPTEUR EXPÉRIMENTAL

Guy DURLIAT

Les élèves montent un biocapteur enzymatique simple et en testent l'activité. Le modèle choisi est historique : c'est celui de l'électrode à glucose (Clark et Lyons, 1962) résultant du couplage d'une électrode à oxygène de Clark avec la glucose-oxydase. L'enzyme peut être associé au capteur ampérométrique sous différentes formes : soluble, ou immobilisé par covalence ou inclusion dans un gel.

Nous décrivons ici la confection de l'électrode avec la GOD soluble. On pourra se reporter à la référence 13 pour l'expérience avec cet enzyme immobilisé dans un gel d'alginate.

Principe

La solution de glucose-oxydase tamponnée est maintenue au contact de l'électrode par une membrane de dialyse - qui retient les protéines -. Le glucose de la solution dans laquelle est plongé le capteur diffuse à travers cette membrane héli-perméable dans le compartiment enzymatique où il est oxydé par la GOD avec consommation de dioxygène : l'électrode ampérométrique révèle la baisse de la teneur du milieu en dioxygène dissous.

Matériel

- Interface Orphy, logiciel Régressi, électrode à oxygène (1-3) et dispositif de mesure : voir 1^{ère} partie,
- facultatif :
 - sonde de température 0-100 °C Micrélec (2),

amplificateur-décaleur physique Micrélec (2).

- tube de dialyse en cellulose de largeur à plat $\frac{3}{4}$ 2.5 cm (par exemple : Visking, référence Polylabo 24002),
- ficelle, ruban adhésif,
- facultatif :
 - seringue de 1 ml avec aiguille longue (4-5 cm),
 - tube plastique à hémolyse scié, de diamètre légèrement supérieur au corps de l'électrode.

Produits

- mélange-réactifs glucose-oxydase GOD : voir 1ère partie,
- solution de glucose dans l'eau distillée à 10 g/l,
- eau physiologique (NaCl 9 g/l).

Les montage, réglage et test de contrôle de l'électrode à oxygène ont été décrits dans la première partie de cet article.

I PREPARATION DU BIOCAPTEUR

I.1. Préparation du sac de dialyse

Le boudin de dialyse est assoupli par trempage dans l'eau. On ferme une extrémité en nouant la membrane sur elle même par un double noeud bien serré puis on la coupe à environ 3 cm de ce noeud.

On emplit le sac ainsi constitué par la solution réactive (tampon + GOD + chromogène + POD) sur environ 1 cm.

Rem : les tubes de dialyse vieillis peuvent être efficacement nettoyés par ébullition 10 min dans une solution Tris-EDTA (Tris-HCl pH 8, 10 mM + EDTA 1 mM) ; on lave abondamment à l'eau distillée et conserve au froid).

I.2. Montage (figure 1)

L'électrode - préalablement reconstituée (figure 1a) et testée comme indiqué dans la première partie - est introduite doucement dans ce sac en éliminant les bulles d'air. On attache le sac à dialyse sur le corps de l'électrode au moyen de la ficelle puis du ruban adhésif (figure 1b).

Une variante consiste à fixer le sac à dialyse sur un tube de plastique scié (figure 1c) ; on charge ce montage avec la GOD et l'ajuste sur l'électrode avec du ruban adhésif (figure 1d). Les tubes ainsi préparés peuvent être conservés (dans l'eau et à froid) et réutilisés après lavages.

II FONCTIONNEMENT DU BIOCAPTEUR

II.1. Réglage

Le biocapteur enzymatique ainsi monté est plongé dans l'eau physiologique de l'eren-meyer (préalablement aérée par agitation).

On peut compléter le dispositif par la mise en place de la seringue remplie (sans bulles d'air !) de la solution de glucose à 10 g/l (figure 2) et éventuellement de la sonde de température permettant alors l'acquisition simultanée des paramètres O_2 et température du milieu.

Le milieu étant agité régulièrement, on amène le curseur à l'écran à 90 % et attend la stabilisation.

Rem :

- 1- le signal O_2 est très sensible à la position de l'électrode et à l'agitation du milieu ; pour éviter des variations par ces facteurs, il est recommandé de fixer l'eren-meyer sur l'agitateur (potence, pince) et de produire une agitation régulière, sans bulles et identique d'un essai à un autre.
- 2- la sonde 0-100 °C peut être amplifiée : l'amplificateur-décaleur physique adapté à l'interface (2) permet d'ouvrir une fenêtre de mesure de 5 °C (par exemple 20-25 °C).

II.2. Acquisition

Avec les menus de Régressi en communication avec Orphy, on programme une acquisition :

- de durée 1 à 2 h,
- à relevé automatique (dans ce cas la fréquence des relevés est asservie à la variation instantanée du signal),
- avec déclenchement au clavier,
- et éventuellement avec sauvegarde automatique (accessible par Fichier/Sauvegarde) si on prévoit plusieurs essais dans un fichier à « pages » (voir 6 ou 7 et les commentaires de la 2ème partie).

On déclenche l'acquisition par frappe de la barre espace ; après quelques minutes (vérification à l'écran de la stabilité), on commence les additions de glucose avec la seringue : de 100 à 300 ml.

II.3. Résultats

L'addition de glucose au milieu est suivie, après un délai de 1 à 2 minutes (on peut faire des mesures de ce temps de réponse) :

- d'une baisse à l'écran de la teneur en dioxygène (figure 3a),
- de l'apparition progressive d'une couleur rouge dans le sac de dialyse,

ce qui indique que l'oxydation enzymatique du glucose se fait bien et qu'elle a lieu dans le compartiment enzymatique du biocapteur, la consommation de l'oxygène par la réaction (la GOD est une flavoprotéine réoxydable par le dioxygène dissous) étant détectée par l'électrode de Clark (se reporter à la 1ère partie pour l'équation de réaction).

La figure 3 donne un exemple de la réponse à l'écran du biocapteur et la superposition des courbes de consommation de l'oxygène de différentes expériences.

Rem :

- 1- peu à peu, alors que la couleur se concentre dans le sac à dialyse, le milieu prend une teinte rose. C'est que le produit coloré de la réaction indicatrice dialyse lentement du sac vers l'eau physiologique.
- 2- pour l'addition des doses de glucose, le dispositif avec seringue est préférable à des ajouts à la surface par micropipette : le glucose déposé près de l'électrode est homogénéisé plus rapidement, le temps de réponse est raccourci. Ce point peut faire l'objet d'une comparaison d'optimisation.

CONCLUSIONS

Cette expérience est conçue pour une première approche des biocapteurs enzymatiques. L'électrode à oxygène employée, par sa simplicité, et le système d'acquisition performant permettent une initiation spectaculaire au couplage capteur électro-chimique - enzyme.

Si le test de fonctionnement est resté ici qualitatif, l'électrode à enzyme constituée peut faire l'objet d'une étude complète de réponse vis à vis de concentrations de glucose (état final, vitesse initiale), parallèle à celle développée dans la 2^{ème} partie de cet article, avec pour objectifs le

principe des dosages par biocapteurs et l'approche de leurs performances.

Une étape suivante est l'immobilisation de l'enzyme (par inclusion dans un gel ou par fixation covalente sur un support) : la couche mince enzymatique conduit alors au montage d'un biocapteur à enzyme immobilisé (13).

Guy DURLIAT (membre du groupe EVARISTE)
Ecole Normale Supérieure de Cachan
Département de Biochimie-Génie Biologique
61 avenue du Président Wilson
94235 Cachan Cedex

RÉFÉRENCES

Matériel informatique et logiciels

1 : Interface Orphy analogique/numérique conçue par le groupe Evariste (DLC15-CNAM), fabriquée et distribuée par MICRELEC, 4 place A. Leblanc, 77120 Coulommiers.

2 : Capteurs (oxygène, température, lumière, pression ...) conçus pour l'interface Orphy par le groupe Evariste et distribués par MICRELEC. Un amplificateur-décaleur permettant d'adapter ou d'amplifier des capteurs pour l'interface Orphy est disponible.

3 : Régressi, logiciel d'acquisition, de traitement et de modélisations de données conçu par J-M. Millet (groupe Evariste) et distribué par MICRELEC. Il est adapté à la plupart des interfaces.

L'électrode à oxygène

4 : « L'électrode à oxygène, capteur d'une réaction enzymatique ». Guy Durliat, *recueil de TP informatisés*, groupe Evariste - CNAM. A paraître.

5 : article issu de l'université d'été de septembre 1992 *Informatique et Enseignement Technique de la Biologie* à paraître dans l'Opéron. Il concerne le suivi informatique de différentes réactions au moyen de l'électrode à oxygène et de l'interface Orphy.

Autres expériences avec Orphy-Régressi

6 : « Acquisition et exploitation de données à l'aide de l'interface Orphy et du logiciel Régressi ». Guy Durliat et J-M. Millet :

- *Bulletin de l'EPI*, sept 90, n°59, 195-208.
- *l'Opéron spécial informatique*, XVI, 1990, n°3-4, 29-46 (journal de l'UPBM : Union des professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie, Lycée La Martinière, avenue Sakharov, 69338 Lyon cedex 9).

7 : « L'informatisation des dosages pHmétriques avec l'interface Orphy et le logiciel Régressi ». Guy Durliat et J-M. Millet :

- *Bulletin de l'EPI*, déc 91, n°64, 163-172,
- *Bulletin de l'EPI*, mars 92, n°65, 103-117,
- *l'Opéron*, XVII, 1991, n°2, 3-16.

8 : Entretiens de la Villette « Les Biotechnologies », 6-7 avril 1991. Présentation d'un réacteur expérimental à enzyme immobilisé suivi par ordinateur et d'un montage vidéo. Guy Durliat. Actes 109-111 (publications de la Cité des Sciences et de l'Industrie).

9 : « Travaux pratiques avec la b-galactosidase ». Guy Durliat : 1ère partie : enzyme solubilisé. *L'Opéron*, XVIII, 1992, n°1, 2ème partie : immobilisation et réacteurs. *L'Opéron*, XVIII, 1992, n°2.

Articles sur les biocapteurs et électrodes à glucose

10 : Les capteurs biologiques. J.C. Nicolas. « 10000 biologistes », *Journal d'information de Boehringer-Mannheim*, n°32.

11 : « Dosage du glucose avec une électrode à membrane enzymatique interchangeable ». B. Maisterrena, R. Couturier, D. Cordier et G. Favre-Bonvin. *L'opéron*, IX, 1983, n°3.

12 : « L'électrode à glucose-oxydase ». N. Giniès et B. Maisterrena. *L'Opéron* XV, 1989, n°3.

13 : « Un biocapteur expérimental suivi par ordinateur ». Guy Durliat et Frédéric Gomel. *L'Opéron*, XVIII, 1992, n°3.

Ouvrages spécialisés

14 : HU Bergmeyer. Principes de l'analyse enzymatique (Tec et Doc 1979) ; p 193 et suiv.

15 : AEG Cass. Biosensors : a practical approach (IRL Press, 1990).

16 : C Tran Minh. Les biocapteurs ; principe, construction et applications (Masson 1991). Commentaire paru dans *l'Opéron* XVII, 1992, n°1.

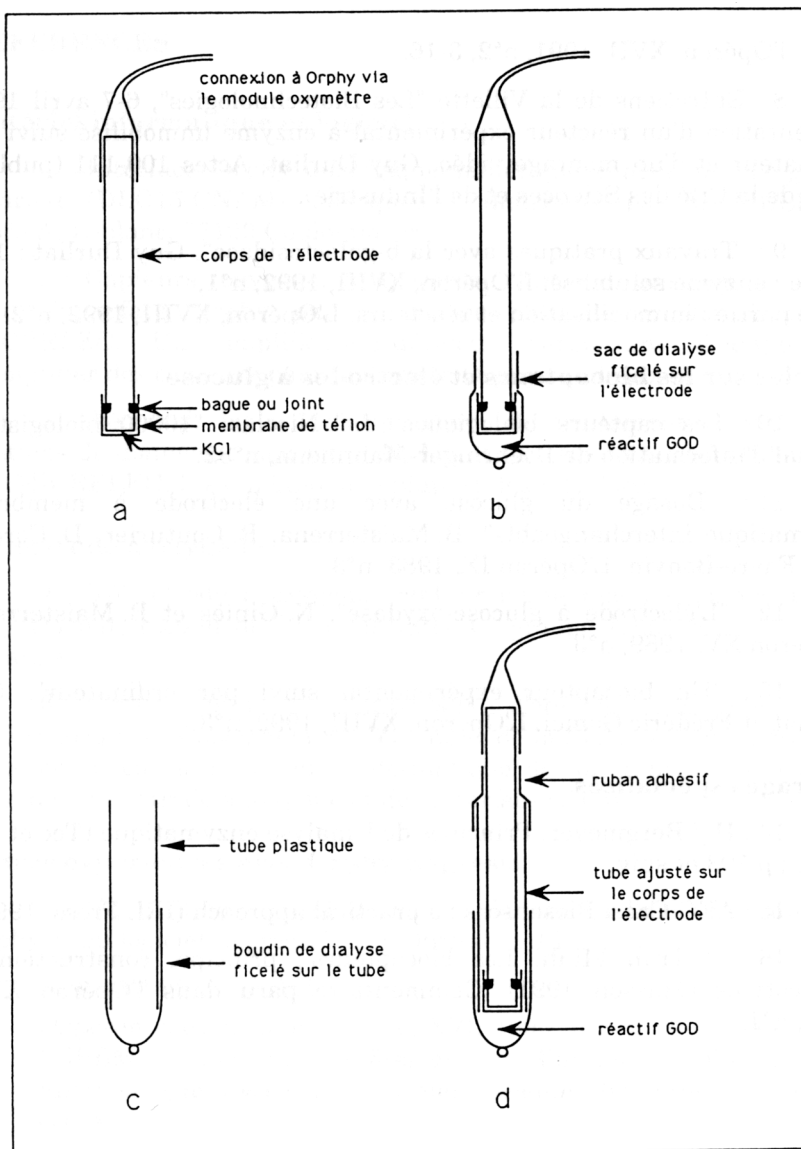


figure 1. Montage d'un biocapteur enzymatique à glucose-oxydase soluble.

L'électrode de Clark Micrélec reconstituée (a) est habillée d'un sac de dialyse contenant le réactif tamponné GOD.

Ce sac est fixé sur le corps de l'électrode soit directement (b), soit au moyen d'une gaine constituée par un tube plastique ouvert (c et d).

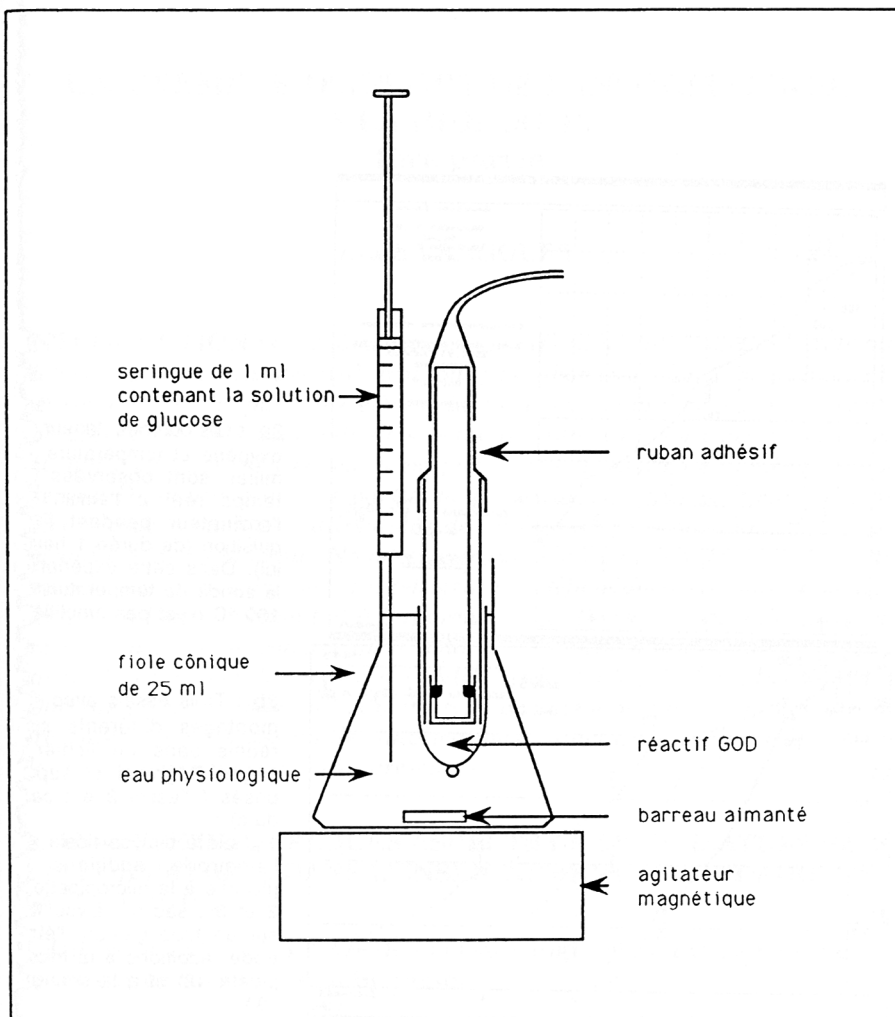
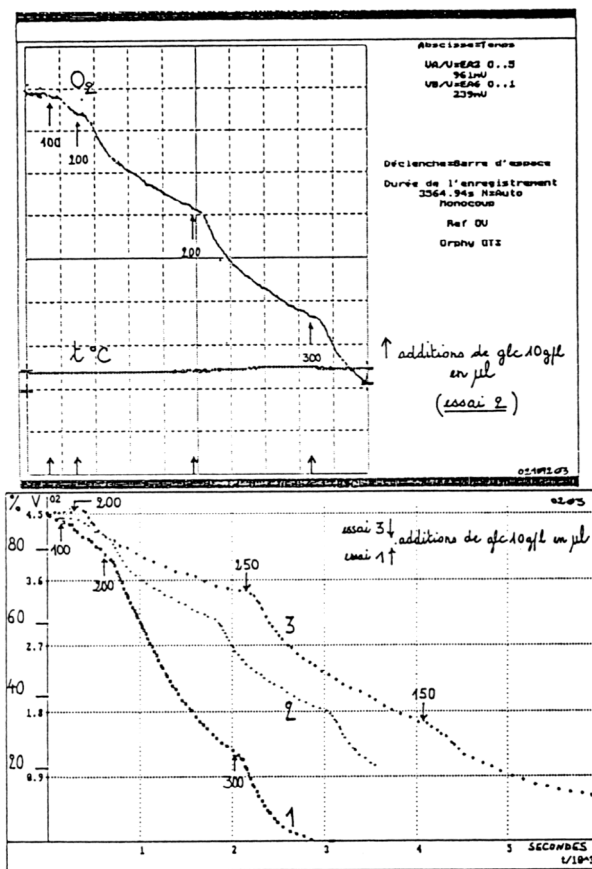


figure 2. Schéma d'un dispositif possible pour le test du fonctionnement du biocapteur.

La seringue n'est pas obligatoire mais elle améliore le temps de réponse de l'électrode enzymatique aux additions de glucose. On peut ajouter une sonde de température ou immerger l'ensemble dans un bain thermostaté.



3a : Les courbes teneur en oxygène et température du milieu sont observées en temps réel à l'écran de l'ordinateur pendant l'acquisition (de durée 1 heure ici). Dans cette expérience la sonde de température 0-100 °C n'est pas amplifiée.

3b : Trois essais avec des montages différents sont réunis dans un fichier à pages Régressi et superposés (l'essai 2 est celui du a) :

1 : sac à dialyse ficelé sur l'électrode, additions du glucose à la micropipette, 2 et 3 : sac à dialyse fixé sur un tube gainant l'électrode, additions à la micropipette (2) et à la seringue (3).

figure 3. Biocapteur à GOD soluble testé avec le système d'acquisition Orphy-Régressi.
 Des doses de glucose sont introduites dans le milieu dans lequel plonge le capteur.